

## INFLUENCIA DEL GRADO DE SULFATACIÓN EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL DERMATAN SULFATO Y DEL CONDRUITÍN SULFATO C

ANDONIADES, S.E.<sup>1</sup>; SCHENONE, M.<sup>1</sup>; RECONDO, E.F.<sup>1</sup>; FERNÁNDEZ DE RECONDO, M.E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Pabellón II, Ciudad Universitaria, Nuñez (1428), Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junín 954 (1111), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Received: October 9, 2000. In final form: October 10, 2001

### ABSTRACT

*The influence of the degree of sulfation of dermatan sulfate and chondroitin sulfate C on their specific anticoagulant activities was studied under several different conditions of temperature, time of the reaction and method of sulfation. It is shown to be very important the use of an homogeneous reaction for sulfation, and very smooth conditions in order to avoid the hydrolysis of labile groups. The results confirm that the degree of sulfation is an important property of the GAGs and an increase of sulfation raises the specific anticoagulant activity of DS and CS-C.*

### RESUMEN

*Se estudió la influencia del grado de sulfatación del dermatan sulfato y del condroitín sulfato C sobre su actividad anticoagulante, bajo diferentes condiciones de temperatura, tiempo de reacción y método de sulfatación. Se demostró que es muy importante realizar la reacción en un medio homogéneo y en condiciones muy suaves para evitar la hidrólisis de los grupos más lábiles. Los resultados obtenidos confirman que el grado de sulfatación de los GAGs es una propiedad importante de los mismos y que la actividad anticoagulante específica de los GAGs aumenta en forma paralela con la sulfatación.*

### INTRODUCCIÓN

Los glicosaminoglicanos (GAGs) constituyen una importante familia de heteropolisacáridos, con funciones biológicas muy diversas y de gran importancia [1]. El esqueleto químico común a todos los GAGs es un disacárido formado por una hexosamina y un ácido urónico. La hexosamina puede ser glucosamina o galactosamina y el ácido urónico, glucurónico o idurónico. En la familia de los GAGs se destacan, por la diversidad y la importancia de sus actividades biológicas, la heparina y el dermatan sulfato. Ambos polisacáridos tienen en común la presencia del ácido idurónico en alta proporción a lo largo de la cadena hidrocarbonada, un grande y variable grado de sulfatación en los dos azúcares que los constituyen, y la presencia de grupos acetilos bloqueando en algunas de las subunidades hexosaminas el grupo amino de las mismas. La existencia del ácido idurónico se la vincula con la actividad anticoagulante que es común a ambos GAGs aunque a nivel de diferentes cofactores de la coagulación [2,3].

El uso de la heparina como antitrombótico está asociado con algunos efectos colaterales, principalmente con las hemorragias. Por ello, las investigaciones de los últimos años se han centrado en la búsqueda, ya de fragmentos de la molécula de heparina que conserven las propiedades antitrombóticas

sin esos efectos hemorrágicos secundarios, o bien de sustancias similares que posean esas mismas propiedades [4]. Así se han aislado diversos tipos de heparinas de bajo peso molecular, (LMWH), entre 4000 y 6000, que tienen el efecto hemorrágico atenuado [5], y se utilizan otras sustancias como el dermatán sulfato (DS), el heparán sulfato (HS) y el pentosán polisulfato (PPS), como compuestos alternativos a la heparina pues también poseen propiedades antitrombóticas.

Un elemento estructural importante para la catálisis de la inhibición de la trombina por un polisacárido sulfatado es el grado de sulfatación, lo que ha sido demostrado recientemente en experimentos con el DS. Este GAG no actúa con la antitrombina (AT), y es activo solamente con el llamado cofactor II de la heparina. Acelera unas 500 veces la velocidad de la interacción de dicho cofactor con la trombina, pero lo hace a concentraciones mucho más altas que la heparina [6]. Los resultados parecían indicar que la interacción de la trombina con el cofactor II tenía una especificidad mucho menor que el sistema T-AT pues el papel principal parecía desempeñarlo la densidad de las cargas de las sustancias intervinientes. En este sentido, Scully y Kakkar demostraron que el GAG semisintético PPS actúa también en el sistema cofactor II/ trombina con velocidades muy similares a la del dermatán sulfato y la heparina [7]. Sin embargo, esta falta de especificidad del sistema resultó ser solo aparente cuando un grupo de investigadores estudió la actividad de diversos GAGs naturales hipersulfatados [8].

Los resultados más interesantes se obtuvieron con el dermatán sulfato hipersulfatado (DS-S). En el sistema cofactor II- trombina la actividad anticoagulante obtenida con el DS-S es similar a la de la heparina sin fraccionar, y se llega a ella con una concentración del GAG que es dos órdenes de magnitud menor que la que se necesita con el DS. Estos resultados sugieren que en la interacción cofactor II- trombina hay un elemento de especificidad mayor que el supuesto previamente. La densidad de las cargas no sería el único requerimiento, adquiriendo importancia la ubicación de los sulfatos en la molécula del GAG.

En nuestro laboratorio se han repetido los experimentos de Ofosu *et al* con el DS, extendiéndolos además al condroitín sulfato A (CS A) [9] y al condroitín sulfato C (CS C) que poseen estructuras similares al DS pero no poseen ácido idurónico. En los tres GAGs la unidad fundamental es un disacárido constituido por un ácido urónico y la acetilgalactosamina en uniones  $\beta 1 \rightarrow 3$ . En el dermatán sulfato los grupos 0-sulfato se encuentran más comúnmente en la posición 4 de los residuos de la acetil galactosamina y, ocasionalmente, en la posición 6 de la misma hexosamina y en la posición 2 del ácido idurónico. El condroitín sulfato A posee generalmente 0-sulfatos en la posición 4 de la acetilgalactosamina, mientras que el condroitín sulfato C los posee en la posición 6 de la hexosamina. Se aplicó una técnica distinta de sulfatación en fase homogénea, teniendo especial cuidado para evitar que durante el aislamiento de los productos se produjera la hidrólisis de los grupos sulfatos introducidos. La sulfatación se siguió por resonancia magnética nuclear.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En un primer paso se repitieron las experiencias de Ofosu *et al* con el reactivo de sulfatación en fase heterogénea, y en diversas condiciones de temperatura y tiempo de reacción. Se obtuvieron los resultados que muestra la Tabla I.

El CS C mostró un comportamiento diferente del CS A. En condiciones idénticas de sulfatación a alta temperatura, (5 horas a 60°C), no se llegó a alcanzar el valor de la actividad anticoagulante específica relativa a la heparina que se había logrado para el CS A [9]. En efecto, se pasó de 0.05  $U_{\text{hep}}/mg$  a 1.5  $U_{\text{hep}}/mg$  contra las 3.0  $U_{\text{hep}}/mg$  a las que se había llegado con el CS A. Sin embargo, al repetir el experimento en condiciones más suaves y durante más tiempo (24 horas a 20°C) la actividad anticoagulante específica del CS C llegó a un valor del orden del obtenido con el CS A. Como veremos más adelante, este resultado puede explicarse por la mayor labilidad del grupo sulfato introducido en

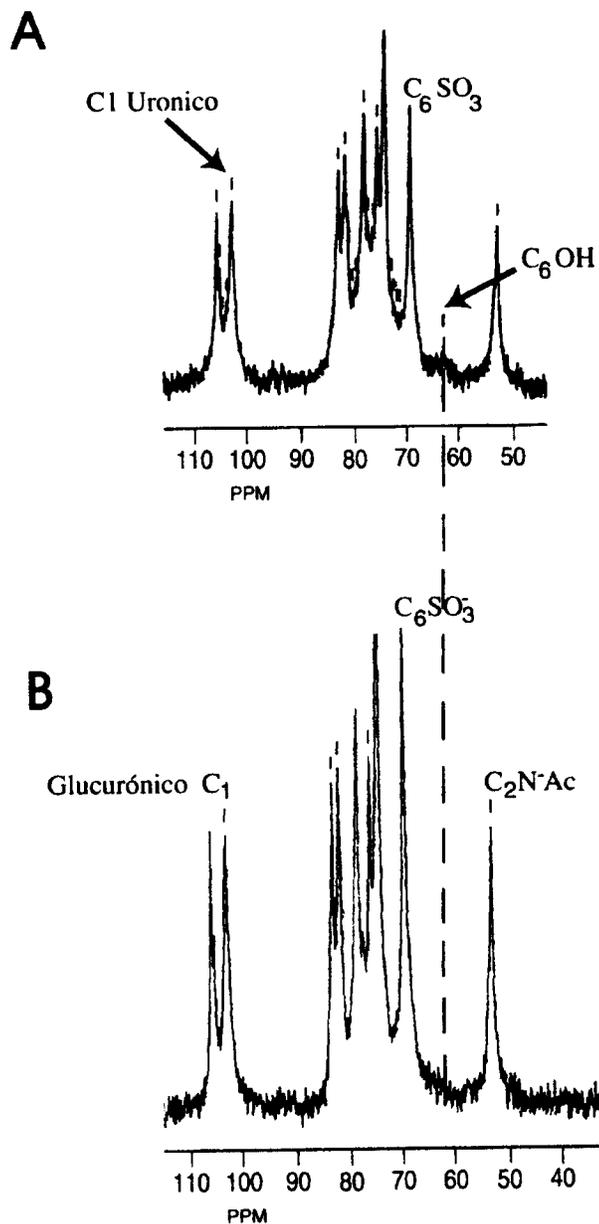
**TABLA 1.** Grado de sulfatación y actividad anticoagulante del CSC y del DS

GAG	Condiciones de la sulfatación	Sulfatos / Disacárido (%en peso)	Actividad específica (U <sub>Heparina</sub> / mg)
CS-C	—	10,60	0,05 ± 0,01
CS-C sulfatado	5 horas a 60° C	18,30	1,50 ± 0,20
	24 horas a 20° C	20,70	3,40 0,30
DS	—	19,20	2,40 ± 0,30
DS sulfatado	20 horas a 60° C	36,30	5,64 ± 0,52
	20 horas a 5° C	47,1	14,90 ± 1,20

el carbono 4 que sufriría una hidrólisis parcial en las condiciones de sulfatación más drásticas. El espectro de resonancia magnética nuclear del CS C después de un tratamiento en esas condiciones (Figura 1 a y b) muestra que la señal del carbono 6' de la hexosamina con el oxhidrilo libre a  $\delta = 62.4$  ppm desaparece totalmente y la señal a  $\delta = 68.4$  ppm correspondiente al carbono 6' con el oxhidrilo sulfatado aumenta en importancia. No alcanzan a distinguirse diferencias entre la señal del carbono 4' con el grupo oxhidrilo libre y la del mismo carbono sulfatado por encontrarse muy cercanas y tratarse de una zona muy densa en señales.

Para las experiencias con el DS se utilizó una muestra suministrada por la fábrica SYNTEX (Hurlingham, Prov. BsAs) que garantiza el 100% de pureza. Cuando se sulfató con la técnica empleada por Ofosu *et al*, la actividad anticoagulante específica pasó de 2.40 a 5.64 U<sub>hep</sub>/mg. De ahí en más se comenzó a utilizar la técnica de sulfatación en fase homogénea descrita por Vijay Nair y Seymour Bernstein de la Medical Research Division de la American Cynamid Company (Pearl River, New York) (ver Parte Experimental). Con el nuevo reactivo se obtuvo una actividad anticoagulante de 14.9 U<sub>hep</sub>/mg, que es el promedio de cuatro determinaciones. Los espectros de <sup>13</sup>C RMN mostraron una sulfatación completa del C6 (OH) y parcial del C4 (OH) del residuo de la hexosamina y también del C2 del residuo del ácido idurónico. (Figura 2 a y b). En el espectro de resonancia magnética del DS puede observarse antes de la sulfatación: la señal del C4' de la hexosamina a un  $\delta = 71.0$  ppm. La señal del C6' de la hexosamina a un  $\delta = 57.0$  ppm y la señal del C2' del ácido idurónico a un  $\delta = 66.0$  ppm. La introducción de grupos sulfatos en la molécula del DS causa un desplazamiento a  $\delta$  mayores, así, la señal del C4' se desplaza a  $\delta = 72.0$  ppm y la señal del C6' a un  $\delta = 64.0$  ppm.

El aumento sustancial de la actividad anticoagulante específica del DS cuando se lo sulfata con el nuevo reactivo cristalino en fase homogénea, unido a las precauciones tomadas para evitar la hidrólisis de grupos lábiles, apoya la hipótesis de una hidrólisis parcial de esos grupos más lábiles durante el aislamiento del producto. Los sustituyentes en el oxhidrilo primario de los hidratos de carbono son siempre más estables que los sustituyentes en los oxhidrilos secundarios, por lo que es muy probable que la sulfatación parcial observada en el DS-S sea el producto de la hidrólisis de sulfatos preformados y no de una sulfatación incompleta. Independientemente de la causa por la que el DS no se sulfata en un 100%, los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis de la necesidad de una sulfatación total del GAG para obtener el máximo de actividad anticoagulante, lo que estaría de acuerdo con el modelo planteado en nuestro laboratorio sobre la base de los experimentos con la Concanavalina A [10,11], y que fueron confirmados cuando se estudió la interacción de la heparina con el primer componente del sistema del complemento humano (C1) [12].



**FIGURA 1.** Espectros de RMN del CS C. Se puede observar que la señal del carbono 6 de la hexosamina unido a OH  $\delta = 62.4$  desaparece y la señal a  $\delta = 68.4$  ppm correspondiente al carbono 6 de la hexosamina sulfatada se hace más importante.

#### PARTE EXPERIMENTAL

**Materiales:** Condroitín sulfato "C" (CSC) sal sódica, de cartilago de tiburón (Sigma Chemical Company). Dermatán sulfato (DS) 100% puro fue una donación de la Cía Syntex S.A. El plasma humano normal fue extraído en nuestro laboratorio. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Para las diálisis se utilizaron membranas de celulosa de Sigma Chemical Company (D-0530) que retienen las proteínas de peso molecular 12.000 o mayores.

**Sulfatación de los Glicosaminoglicanos:**

**Reactivo 1:** 2 ml de ácido clorosulfónico, 1 ml de piridina y 27 ml de dimetil formamida.(DMF)

**Técnica 1:** Se utilizó el método descrito por Ofosu *et al* para la sulfatación del CS A, CS C y DS. Se basa en la reacción en fase heterogénea del GAG (0.5g) con 5 ml del reactivo 1 en diversas condiciones de tiempo y temperatura con agitación ocasional. Al término de la reacción se dejó decantar el sólido y se lavó consecutivamente con DMF e isopropanol. El sólido se disuelve en agua destilada y se neutraliza con NaOH. Finalmente se dializa 24 horas contra agua destilada. En algunos casos se probó también una sulfatación menos drástica. Se pasa el GAG por una resina de intercambio catiónico ( $H^+$ ) y se neutraliza con piridina. (pH 6.5). Se evapora hasta sequedad a presión reducida y baja temperatura. y se resuspende en el reactivo 1. Terminada la reacción se dializa contra NaOH 0.2% durante 4 horas y 24 horas más contra agua destilada.

En ambos casos el grado de sulfatación se determinó por el método del rodizonato sódico descrito por Terho y Hartiala. [9]

**Reactivo 2:** se sintetizó en el laboratorio según el método descrito por Vijar Nair y Seymour Bernstein. Es un complejo de trióxido de azufre con una amina que lleva a productos de sulfatación con menos reacciones secundarias y con mayor grado de sulfatación.

**Técnica 2:** A una solución de trietilamina 3M en cloruro de metileno se agrega gota a gota en baño de hielo una solución de ácido clorosulfónico 3M en cloruro de metileno. Se produce una reacción vigorosa y precipita el clorhidrato de la amina. Cuando finaliza la reacción se vuelca sobre hielo y se separa la fase orgánica, se seca y se evapora a presión reducida y baja temperatura. El producto se recristaliza de cloruro de metileno/ heptano. Se obtienen cristales incoloros brillantes de punto de fusión 84-85°C.

El GAG a sulfatar se pasó por resina de intercambio catiónico ( $H^+$ ) para convertirlo en su forma ácida y se transformó en la sal orgánica correspondiente por neutralización con trietilamina. Se evaporó a sequedad a presión reducida y baja temperatura y se disolvió en DMF.

La sulfatación se lleva a cabo en fase homogénea, GAG y reactivo disueltos en DMF a la temperatura y tiempo fijado. Para evitar la hidrólisis del producto se terminó la reacción enfriando con baño de hielo y agregando lentamente NaOH hasta pH 8-8.5. Se agregan 3 volúmenes de etanol y acetato de sodio hasta turbidez. Se dializó contra agua destilada durante 24-48 horas.

**Dosaje de los Glicosaminoglicanos:**

1. Método del Indol – HCl: se aplica la técnica de Rodríguez Montelongo *et al* [11].
2. Método del fenol – sulfúrico: se aplica la técnica de Dubois *et al* [11].

**Determinación de la actividad anticoagulante**

Se determinó por la técnica de Freeman *et al* [11] que se basa en la recalcificación del plasma humano normal. Se usó una solución de heparina de 10 U/ml (H-0880) from Sigma Chemical Company para construir la curva de coagulación, desde 0.05 U<sub>heparina</sub> a 0.2 U<sub>heparina</sub> llevando a un volumen final de 0.2 ml con solución fisiológica. Se agregaron 0.2 ml de plasma humano normal. Se recalcificó con cloruro de calcio al 2% (0.050 ml). Los resultados se expresan en unidades de actividad específica: U<sub>heparina</sub> / mg.

### **Análisis por resonancia magnética nuclear**

Los de  $^{13}\text{C}$  RMN fueron realizados en un espectrofotómetro Bruker AC 200 de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

### **AGRADECIMIENTOS**

Esta investigación fue financiada con subsidios de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires. La Licenciada Silvia Andoniades se desempeñó como becaria de la Universidad de Buenos Aires. Se agradece a la Bioquímica Claudia Jatimlansky por su colaboración en la determinación de los sulfatos.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- [1] Jackson, R.L.; Bush, S.J.; Cardin, A.D. *Physiol. Rev.* **1991**, 71(2), 481.
- [2] Lindahl, U. en *Heparin: Chemical and Biological Properties, Clinical Applications* (Lane, D.A.; Lindahl, U., eds) Edward Arnold, London, **1989**, p.159.
- [3] Tollefsen, D.M.; Majerus, D.W.; Blank, M.K. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 2161.
- [4] Hemker, H.C.; Beguin, S.; Kakkar, V.V. *Haemostasis.* **1996**, 26, 117.
- [5] Barrowcliffe, T.W.; Johnson, T.E.A.; Thomas, D.P. *Low molecular weight heparin*. Chichester, Wiley, **1992**.
- [6] Tollefsen, D.M.; Blank, M.K. *J. Clin. Invest.* **1981**, 68, 589.
- [7] Scully, M.F.; Ellis, V.; Kakkar, V.V. *Thromb. Res.* **1986**, 41, 489.
- [8] Ofosu, F.A.; Modi, G.J.; Blajchman, M.A.; Buchanan, M.R.; Johnson, A. *Biochem. J.* **1987**, 248, 889.
- [9] Andoniades, S.E.; Recondo, E.F.; Fernández de Recondo, M.E. *An. Asoc. Quim. Arg.* **1998**, 86, 243.
- [10] Fernández de Recondo, M.E.; Legorburu, C.; Monge, J.C.; Recondo, E.F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, 155 (1), 216.
- [11] Fernández de Recondo, M.E.; Monge, J.C.; Recondo, E.F. *Cell. Mol. Biol.* **1995**, 41(4), 465.
- [12] Calabrese, G.C.; Recondo, M.M.; Fernández de Recondo, M.E.; Recondo, E.F. *Cell. Mol. Biol.* **1997**, 43(2), 237.